

① BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧ EP 0 608 636 B1

⑩ DE 693 08 531 T 2

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 08 B 37/02**  
C 12 P 19/18  
C 12 N 9/44

② Deutsches Aktenzeichen:	693 08 531.2
③ Europäisches Aktenzeichen:	93 310 579.3
④ Europäischer Anmeldetag:	24. 12. 83
⑤ Erstveröffentlichung durch das EPA:	3. 8. 94
⑥ Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	6. 3. 97
⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt:	28. 8. 97

③ Unionspriorität: ③ ③ ③

28.12.82 JP 349444/92 24.08.83 JP 153456/93

④ Patentinhaber:

Kikkoman Corp., Noda, Chiba, JP; Noda Institute for  
Scientific Research, Noda, Chiba, JP

⑤ Vertreter:

TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR  
Patentanwälte, 81879 München

⑥ Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, NL, SE

⑦ Erfinder:

Ogumam, Tetsuya, c/o Noda Institute for, Noda-shi,  
Chiba-ken, JP; Horiuchi, Tatsuo, c/o Noda Institute  
for, Noda-shi, Chiba-ken, JP; Tobe, Koichiro, c/o  
Noda Institute for, Noda-shi, Chiba-ken, JP

⑧ Cycloisomaltoligosaccharide; Enzym und Verfahren zu ihrer Herstellung, und Verfahren zur Herstellung von  
dem Enzym

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die  
Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das  
erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und  
zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist  
(Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht  
worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 693 08 531 T 2

**Cycloisomaltooligosaccharide; Enzym und Verfahren zu ihrer Herstellung, und  
Verfahren zur Herstellung des Enzyms**

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft Isomaltooligosaccharide, Isomaltooligosaccharid-Synthase, welche die Oligosaccharide aus Dextran bildet, und ein Verfahren zur Herstellung der Oligosaccharide unter Verwendung des Enzyms oder eines zur Produktion des Enzyms befähigten Mikroorganismus.

2. Beschreibung des Stands der Technik

- 10 Ein Cyclodextrin aus 6-8 Glukoseresten, die durch  $\alpha$ -1,4-Bindungen verknüpft sind, ist üblicherweise unter Cyclooligosacchariden gut bekannt. Das Cyclodextrin besitzt wegen seiner Hydrophobizität im Zentrum des Rings die Fähigkeit (Einschlußvermögen), an eine Vielzahl hydrophober Stoffe zu binden. Wegen dieser Eigenschaft wurde die Verbindung zur Stabilisierung und Verbesserung der Löslichkeit, etc. verschiedener Stoffe auf vielen  
15 Gebieten, wie Arzneimittel, Kosmetika, Nahrungsmittel, etc., verwendet und entwickelt (Handbook of Amylases and Related Enzymes, 233-243 (1988), zusammengestellt von der Japanese Amylase Research Society).

- In den letzten Jahren wurden auch aus 6-8 Fructoseresten in  $\beta$ -2,1-Bindung bestehende Cyclooligosaccharide gefunden, von denen erwartet wird, daß sie, ähnlich wie Cyclo-  
20 dextrin, auf vielen Gebieten Anwendung finden (Carbohydr. Res., Bd. 192 (1989), 83-90).

- Zusätzlich zu den vorstehend erwähnten Sacchariden wurde eine große Vielzahl von Cyclooligosacchariden, wie aus 17-24 Glukoseresten in  $\beta$ -1,2-Bindung aufgebaute Cyclo-  
sophoraose, Cyclogentiooligosaccharide aus 3-4 Glukoseresten in  $\beta$ -1,6-Bindung, mit 6 Rhamnosemolekülen cyclisiertes Cycloawaodorin, mit 6 Mannosemolekülen cyclisierte  
25 Cyclomannohexaose, etc., enzymatisch oder chemisch synthetisiert.

Jedoch war bisher kein Cyclooligosaccharid aus Glukoseresten bekannt, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind.

Ziele und Zusammenfassung der Erfindung

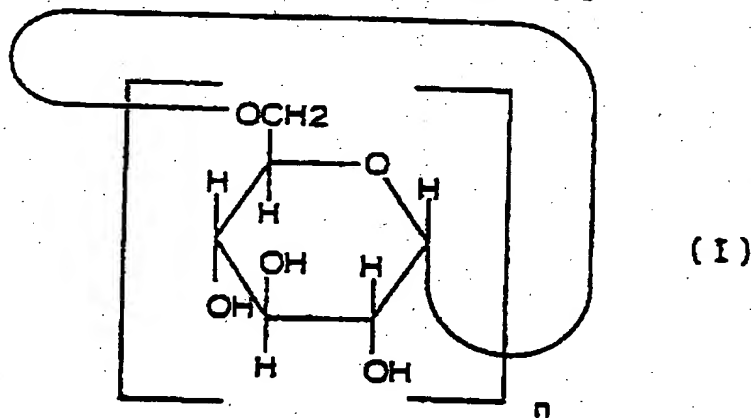
- Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Cycloisomaltooligosac-  
30 chariden aus Glukosen, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind, von denen erwartet

wird, daß sie besonders nützlich sind, eines Verfahrens zur Herstellung derselben, Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase, die diese Oligosaccharide aus Dextran bildet, und eines Verfahrens zur Herstellung des Enzyms.

Als Ergebnis der Durchmusterung von Böden auf einen Mikroorganismus, welcher Cyclooligosaccharide aus Dextran bildet, stellten die hier genannten Erfinder fest, daß ein zur Gattung *Bacillus* gehöriger Bakterienstamm Cyclooligosaccharide und Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase produziert.

Das heißt, die vorliegende Erfindung umfaßt:

- 1) Cycloisomaltooligosaccharid, gewählt aus der Cycloisomaltoheptaose mit einer aus 7 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur, Cycloisomaltooctaose mit einer aus 8 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur und Cycloisomaltotonaose mit einer aus 9 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur umfassenden Gruppe.
- 2) Cycloisomaltooligosaccharid nach Punkt 1), wiedergegeben durch Formel (I):



worin  $n$  für eine ganze Zahl von 7-9 steht.

- 3) Cycloisomaltooligosaccharid nach Punkt 2), worin  $n$  für 7 steht.
- 4) Cycloisomaltooligosaccharid nach Punkt 2), worin  $n$  für 8 steht.
- 5) Cycloisomaltooligosaccharid nach Punkt 2), worin  $n$  für 9 steht.
- 6) Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase mit den physikochemischen Eigenschaften:
  - ① Wirkung auf ein Polymer aus Glukosen, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind, wie Dextran, zur Bildung eines Cycloisomaltooligosaccharids durch intramolekulare Transglykosylierungsreaktion;

- ② Substratspezifität der Wirkung auf Dextran mit einer  $\alpha$ -1,6-Bindung als eine Hauptkette, jedoch nicht auf Amylopektin und Pullulan mit einer nur teilweisen  $\alpha$ -1,6-Bindung von Glukosen in der Struktur; und
- ③ optimaler pH in der Umgebung von pH 5,5 und Stabilitäts-pH im Bereich von pH 4,5-8,5.
- 7) Verfahren zur Herstellung von Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase, umfassend das Kultivieren in einem dextranhaltigen Medium eines zur Gattung Bacillus gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym gemäß Punkt 6) zu produzieren, und dann Gewinnen des Enzyms aus der Kultur.
- 10 8) Verfahren zur Herstellung der Cycloisomaltooligosaccharide, umfassend das Wirkenlassen des Enzyms nach Punkt 6) auf Dextran, um Cycloisomaltooligosaccharide zu bilden.
- 15 9) Verfahren zur Herstellung der Cycloisomaltooligosaccharide, umfassend das Wirkenlassen einer mikroorganismusfreien Mischung, die durch Kultivieren in einem dextranhaltigen Medium eines zur Gattung Bacillus gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym nach Punkt 6) zu produzieren, erhalten worden ist, auf Dextran, um die Cycloisomaltooligosaccharide zu bilden.
- 20 10) Verfahren zur Herstellung von Cycloisomaltooligosacchariden, umfassend das Kultivieren in einem  $\alpha$ -1,6-glukanhaltigen Medium eines zur Gattung Bacillus gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Cycloisomaltooligosaccharid gemäß Punkt 1) zu produzieren, und dann Gewinnen des Cycloisomaltooligosaccharids aus der Kultur.

Die vorliegende Erfindung wird nachstehend ausführlicher beschrieben.

25 Die Erfinder beschreiben zuerst die physikochemischen Eigenschaften der neuen Cycloisomaltooligosaccharide (Cycloisomaltoheptaose, Cycloisomaltooctaose und Cycloisomaltononaose) und weisen sie anschließend auf der Grundlage der Eigenschaften als Cyclooligosaccharide aus.

30 1. Die Elementaranalyse zeigte, daß die vorliegenden Verbindungen cyclische Heptamere, Octamere bzw. Nonamere aus Glukosen sind, wie durch die folgenden Daten bewiesen wird: -

Cycloisomaltoheptaose (als  $C_{42}H_{70}O_{35} \cdot 3H_2O$ )

Berechnet: C: 42,43%, H: 6,44%

Ermittelt: C: 42,78%, H: 6,33%

Cycloisomaltooctaose (als  $C_{48}H_{80}O_{40} \cdot 4H_2O$ )

Berechnet: C: 42,11%, H: 6,48%

Ermittelt: C: 42,37%, H: 6,24%

Cycloisomaltononaose (als  $C_{54}H_{90}O_{45} \cdot 5H_2O$ )

Berechnet: C: 41,86%, H: 6,51%

Ermittelt: C: 41,53%, H: 6,18%

- 10 2. Die Massenspektrometrische Analyse ergab die folgenden Molekulargewichte (bestimmt mit dem von Hitachi Seisakusho Co., Ltd. hergestellten Massenspektrometer 80B):

Cycloisomaltoheptaose: 1134

Cycloisomaltooctaose: 1296

Cycloisomaltononaose: 1458

- 15 Die Ergebnisse stimmen mit den für ihre Molekülformel annähernd berechneten Molekulargewichten überein.

3. Die genauen Schmelzpunkte der vorliegenden Verbindungen konnten mit einem von Yanagimoto Co., Ltd. hergestellten Schmelzpunkt-Meßgerät nicht bestimmt werden. Ihre Verflüchtigungstemperaturbereiche zusammen mit ihrer Zersetzungstemperatur sind wie folgt:

20 Cycloisomaltoheptaose: 234-238°C

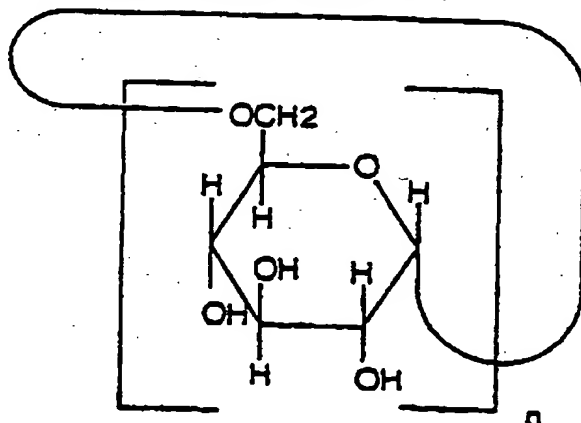
Cycloisomaltooctaose: 238-241°C

Cycloisomaltononaose: 239-242°C

- 25 4. Ihre UV-Absorptionsspektren zeigten keine charakteristische Absorption (gemessen mit dem Spektrophotometer 775, hergestellt von Hitachi Seisakusho Co., Ltd.). Dieses Ergebnis legt die Abwesenheit von solchen funktionellen Gruppen, wie Amino-, Carboxylgruppen, etc., nahe.

- 30 5. Figur 1 zeigt ihre Infrarot-Absorptionsspektren, aufgezeichnet mit dem IR-Spektrometer Modell FT/IR-7300, hergestellt von Nihon Bunko Co., Ltd. Cyclische Heptamere, Octamere bzw. Nonamere aus Glukosen sind in Figur 1A, B und C gezeigt, wobei die die  $\alpha$ -1,6-Bindung kennzeichneten Absorptionspeaks bei  $917 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  und  $768 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$  die Gegenwart von  $\alpha$ -1,6-Bindungen in den Oligosacchariden anzeigen.

6. Die Löslichkeit der Olig saccharide in einem Lösungsmittel beträgt mindestens 20 mg/l bei Raumtemperatur.
7. Das Somogyi-Nelson-Verfahren legt die Abwesenheit einer reduzierenden Endgruppe in den Oligosacchariden sehr nahe.
- 5 8. Die vorliegenden Verbindungen sind weiße Stoffe mit neutralem pH.
9. Ihre cyclische Struktur wurde im  $^{13}\text{C}$ -NMR durch die Gegenwart von nur 6 Signalen gestützt, die mit dem NMR-Spektrometer Modell NM-FX200, hergestellt von Nihon Denshi Co., Ltd., aufgezeichnet wurden. Die Analyse der Isomaltoheptaose legt eine  $\alpha$ -1,6-Bindung als Bindungstyp sehr nahe.
- 10 Die vorliegenden Verbindungen wurden wie folgt enzymatisch analysiert:
10. Man ließ Glukodextranase, d.h. Dextranase vom Exo-Typ, auf die vorliegenden Verbindungen (1%ige Lösung) einwirken, jedoch wurden sie nicht vollständig hydrolysiert, wie in Figur 2 gezeigt. Unter den gleichen Bedingungen wurden Isomaltohexaose und Isomaltoheptaose vollständig hydrolysiert. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die vor-
- 15 liegenden Verbindungen keine linearen Isomaltooligosaccharide sind.
11. Die vorliegenden Verbindungen (1%ige Lösung) wurde mit einer Dextranase vom Endo-Typ in Glukose und Isomaltose aufgespalten. Dies legt nahe, daß die vorliegenden Verbindungen (Oligosaccharide) ausschließlich in Glukosereste als Bestandteileinheiten, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind, aufgespalten werden.
- 20 Durch die Ergebnisse der vorstehenden Punkte 1 bis 11 wurde bewiesen, daß die vorliegenden Verbindungen Cyclooligosaccharide sind, welche aus 7-8 durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpfte Glukoseresten bestehen. Die chemische Struktur der Cycloisomaltooligosaccharide wird durch Formel (I) wiedergegeben:



( I )

25 worin n für eine ganze Zahl von 7-9 steht.

Wie vorstehend ausführlich erläutert, unterscheiden sich die vorliegenden Cyclooligosaccharide von herkömmlichen Cyclooligosacchariden hinsichtlich der Eigenschaften völlig und sind vollkommen neu, da sie aus Glukosen bestehen, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind. Wegen ihrer cyclischen Struktur weisen die vorliegenden Verbindungen ein zur Stabilisierung und Solubilisierung von Stoffen unterschiedlicher Größe, die nicht von Cyclodextrin umhüllt werden, nützliches Einschlußvermögen auf und sie werden insbesondere als Einschlußmittel für Arzneimittel und Nahrungsmittel verwendet.

Die vorliegende Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase weist folgende enzymchemischen Eigenschaften auf:

- ① Wirkung auf ein Polymer aus Glukosen, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind, wie Dextran, etc., zur Bildung eines Cycloisomaltooligosaccharids durch intramolekulare Transglykosylierungsreaktion;
- ② Substratspezifität der Wirkung auf Dextran mit einer  $\alpha$ -1,6-Bindung als eine Hauptkette, jedoch nicht auf Amylopektin und Pullan, etc. mit einer nur teilweisen  $\alpha$ -1,6-Bindung von Glukosen in der Struktur; und
- ③ optimaler pH in der Umgebung von pH 5,5 und Stabilitäts-pH im Bereich von pH 4,5-8,5.

Wie vorstehend beschrieben, unterscheiden sich das vorliegende Enzym hinsichtlich der Eigenschaften von herkömmlichen Cyclooligosaccharid-Synthasen, Cyclodextrin-Glukanotransferase (hier nachstehend bezeichnet als "CGTase"; EC 2.4.1.19), Cycloinulo-oligosaccharid-Synthase (hier nachstehend bezeichnet als "CFTase") und der cyclischen  $\beta$ -1,2-Glukan-Synthetase insofern, als es aus Dextran ein Cyclooligosaccharid aus Glukosen bildet, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind. Ähnlich CGTase und CFTase ist das vorliegende Enzym ein multifunktionelles Enzym, das neben der intramolekularen Transglykosylierungsreaktion die Reaktion (Kupplungsreaktion) zur Bildung eines Iso-maltooligosaccharids mit einem OH-Akzeptor katalysiert, welcher durch die intramolekulare Transglykosylierungsreaktion eines Cycloisomaltooligosaccharids und einem geeigneten OH-Akzeptor daran gebundenen wird, sowie die Reaktion (Disproportionierungsreaktion) zur Bildung von Isomaltooligosacchariden mit verschiedenen Polymerisierungsgraden aus Isomaltooligosacchariden.

Nachstehend wird ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Enzyms beschrieben.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Mikroorganismus kann ein beliebiger zur Gattung *Bacillus* gehöriger Mikroorganismus sein, der in der Lage ist, Cycloisomaltoligosaccharid-Synthase zu bilden, und ein Beispiel ist *Bacillus* Sb. T-3040.

5 *Bacillus* Sb. T-3040 ist ein durch das Durchmustern von Böden erhaltener Wildstamm und weist die folgenden bakteriellen Eigenschaften auf:

(1) Morphologische Merkmale

	1. Form	<i>Bacillus</i>
	2. Beweglichkeit	erkennbar
	3. Sporen	vorhanden
10	Sporangium	Ausstülpung
	Position	(zentral oder subterminal)
	4. Gramfärbung	+

(2) Wachstumsformen

	1. Fleisch-Agar-Plattenkultur	gleichmäßig und ohne Pigmentbildung
15	2. Fleisch-Agar-Schräglkultur	gleichmäßig und ohne Pigmentbildung

(3) Physiologische Eigenschaften

	1. Nitratreduktion	-
	2. Denitrifizierung	-
	3. MR-Test	-
20	4. VP-Test	-
	5. Indolbildung	-
	6. Schwefelwasserstoffbildung	-
	7. Stärkehydrolyse	+
	8. Citronensäureverwertung	-
25	9. Verwertung anorganischer Stickstoffquellen	
	Nitrat	-
	Ammoniumsalz	+
	10. Harnstoff	-
	11. Oxidase	-
30	12. Katalase	+
	13. Wachstumstemperaturbereich	10-37°C
	14. Verhalten gegenüber Sauerstoff	aerob
	15. O-F-Test	-



## 16. Verhalten gegenüber Zuckern:

	Säurebildung	Gasbildung
(1) L-Arabinose	+	-
(2) D-Xylose	-	-
(3) D-Glukose	+	-
5 (4) D-Mannose	-	-
(5) D-Fructose	-	-
(6) D-Galaktose	+	-
(7) Maltose	+	-
(8) Saccharose	+	-
10 (9) Lactose	+	-
(10) Trehalose	+	-
(11) D-Sorbitol	-	-
(12) D-Mannitol	-	-
(13) Inositol	-	-
15 (14) Glycerin	-	-
(15) Stärke	+	-

Der Bakterienstamm T-3040 ist ein sporenbildender, Gram-positiver Mikroorganismus und die hier genannten Erfinder kennzeichneten ihn als einen zur Gattung *Bacillus* gehörigen Mikroorganismus, jedoch konnten sie seine Art trotz umfassender Kennzeichnung auf der Grundlage von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Bd. 2, nicht identifizieren. Dieser Mikroorganismus, der lediglich als ein zur Gattung *Bacillus* gehöriger Bakterienstamm identifiziert wurde, wurde bezeichnet als *Bacillus* sp. T-3040 und unter der Hinterlegungsnummer FERM BP-4132 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Japan, hinterlegt.

Der erfindungsgemäße Mikroorganismus wird in der gleichen Weise wie herkömmliche Mikroorganismen üblicherweise in einer Schüttelkultur in Flüssigmedium, einer Spinnerkultur unter Belüftung, etc. aerob kultiviert. Das verwendete Medium setzt sich z.B. aus einer geeigneten Stickstoffquelle (z.B. Caseinhydrolysate, wie Pepton, Polypepton, Bactotrypton etc., oder Sojabohnenproteinhydrolysate, wie Soyton), einer Kohlenstoffquelle (z.B. mit Zuckeranteilen, wie Glukose, Glycerin etc.) und, falls erforderlich, Hefeextrakt, Vitaminen, wie Riboflavin etc., und Phosphaten, Magnesiumsalz, Natriumchlorid, Mineralien, z.B. Spurenelementen, und Dextran, das als Ausgangsmaterial für die vorliegenden Cycloisomaltopoligosaccharide dient, zusammen. Der pH des Mediums kann in einem pH-Bereich liegen, in dem der erfindungsgemäße Mikroorganismus wachsen kann, vorzugsweise bei pH 6-8.

Der Mikroorganismus wird z.B. unter Schütteln oder Rühren unter Belüftung bei üblicherweise 20-40°C, vorzugsweise 30°C, und während 16 Stunden bis 6 Tage, vorzugsweise 3 Tage, kultiviert.

5 Die erfindungsgemäße Cyclooligosaccharid-Synthase wird aus der resultierenden Kultur zum Beispiel gemäß dem folgenden Enzymreinigungsschritt erhalten. Eine mikroorganismussfreie Enzympräparation, welche lediglich durch das Zentrifugieren der Kultur und das anschließende Konzentrieren des resultierenden Überstands über eine Membran erhalten wurde, kann zur Herstellung der erfindungsgemäßen Cyclooligosaccharide verwendet werden, und, falls erforderlich, wird aus dieser rohen Enzympräparation ein ge-  
10 reinigter Standard in üblicher Weise erhalten.

Jedes herkömmliche Reinigungsverfahren kann für das erfindungsgemäße Enzym angewendet werden. Ein hochreiner Cyclooligosaccharid-Synthase-Standard kann durch das Behandeln einer mikroorganismussfreien Kultur, wie nachstehend beschrieben, erhalten werden.

15 Dann läßt man das erfindungsgemäße Enzym auf Dextran zur Bildung der Cycloisomaltooligosaccharide einwirken.

Die Enzymreaktion wird bei 10-60°C, vorzugsweise 40°C, bei pH 4,5-8,0, vorzugsweise 5,0-6,5, und während 10-72 Stunden, vorzugsweise 48 Stunden, ausgeführt. Falls erforderlich, kann die Reaktionslösung gerührt und ein organisches Lösungsmittel, wie Methanol, Ethanol, etc., zu der Reaktionslösung zugegeben werden.  
20

Bei dem vorliegenden Verfahren können die Cycloisomaltooligosaccharide durch die Verwendung des vorstehend erwähnten mikroorganismussfreien Konzentrats der Kultur mit der gleichen Effizienz gebildet werden, wie sie durch die Verwendung des gereinigten Enzyms erzielt wird. Jedes Reinigungsverfahren für herkömmliche Oligosaccharide kann  
25 ebenfalls als Verfahren zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Oligosaccharide aus der Reaktionslösung angewendet werden. Auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren, wie Kühlen, Behandeln mit einem organischen Lösungsmittel oder Aktivkohle, Chromatographie auf einer Aktivkohlesäule oder einer Cyclooligosaccharid-spezifischen Adsorptionssäule, etc., können einzeln oder in Verbindung miteinander angewendet werden.

30 Die erfindungsgemäßen Cycloisomaltooligosaccharide können z.B. auch durch den nachstehend beschriebenen Gewinnungsschritt aus einer Kultur des Mikroorganismus in einem Medium mit einem  $\alpha$ -1,6-Glukan, wie Dextran, erhalten werden.

Die Kultur wird zur Entfernung der Mikroorganismen zentrifugiert und dann über eine Membran konzentriert. Das auf diese Weise erhaltene mikroorganismusfreie Konzentrat wird einem Reinigungsverfahren für herkömmliches Cyclodextrin unterzogen, wobei hochreine Cyclooligosaccharid-Fractionen erhalten werden.

- 5 Eine hochreine Probe eines jeden Cyclooligosaccharids kann durch ein Reinigungsverfahren, wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf einer Trennungs-Adsorptionssäule, etc., erhalten werden. Herkömmliche Verfahren, wie Kühlen, Behandeln mit einem organischen Lösungsmittel oder Aktivkohle, Chromatographie auf einer Aktivkohlesäule oder einer Cyclooligosaccharid-spezifischen Adsorptionssäule, etc., können  
10 einzeln oder in Verbindung miteinander zur Reinigung der Cycloisomaltooligosaccharide aus dem mikroorganismusfreien Kulturkonzentrat angewendet werden.

- Erfindungsgemäß können neue Cycloisomaltooligosaccharide, welche aus durch eine  $\alpha$ -1,6-Bindung verknüpfte Glukoseresten aufgebaut und als Einschlußmittel für Arzneimittel, Nahrungsmittel, etc. nützlich sind, und ein Verfahren zur Herstellung von hoch-  
15 reinen Oligosacchariden in hoher Ausbeute durch die Verwendung eines zur Gattung *Bacillus* gehörigen Mikroorganismus bereitgestellt werden. Ferner kann erfindungsgemäß auch eine Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase bereitgestellt werden, die es ermöglicht, daß diese Cycloisomaltooligosaccharide gemäß einem sehr einfachen Verfahren in einer hohen Ausbeute effizient hergestellt werden. Deshalb ist die vorliegende Erfindung in der  
20 Industrie äußerst nützlich.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Figur 1 zeigt Infrarotabsorptionsspektren der drei erfindungsgemäßen Cycloisomaltooligosaccharide.

- 25 Figur 2 zeigt das Ergebnis der enzymatischen Analyse der drei erfindungsgemäßen Cycloisomaltooligosaccharide.

Figur 3 zeigt das Ergebnis der HPLC-Analyse der drei erfindungsgemäßen Cycloisomaltooligosaccharide (A: ein Eluat bei der Chromatographie auf Aktivkohle; B-D: einzelne Cyclooligosaccharide).

Figur 4 zeigt HPLC-Profile der drei erfindungsgemäßen Cycloisomaltooligosaccharide.

### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Die vorliegende Erfindung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele ausführlicher beschrieben, welche jedoch den Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung nicht begrenzen sollen.

#### 5 Beispiel 1

3 ml eines Flüssigmediums (Leitungswasser, pH 7,0), zusammengesetzt aus 1% Dextran T2000, 1% Pepton, 0,5% NaCl und 0,1% Hefeextrakt, wurden in ein 15 ml-Teströhrchen eingebracht und dann bei 120°C während 20 Minuten sterilisiert. Der Mikroorganismus *Bacillus* sp. T-3040 (FERM BP-4132) wurde auf das Medium überimpft und bei 30°C während einem Tag unter Schütteln kultiviert. Anschließend wurde die Kulturlösung (3 ml) auf 2 l Medium in einem 3 l-Minigeß mit der gleichen Mediumzusammensetzung überimpft, das unter den gleichen Bestimmungen, wie vorstehend beschrieben, sterilisiert wurde, und der Mikroorganismus wurde bei 30°C, 0,25 vvm und 350 Upm während 2 Tagen unter Schütteln aerob kultiviert. Nach Beendigung der Kultur wurde die Kultur bei 8000 Upm während 20 Minuten zentrifugiert, um sie in ein Bakterienpräzipitat und einen Überstand als mikroorganismusfreie Kultur aufzutrennen.

Der Überstand wurde auf eine Aktivkohlesäule aufgetragen und anschließend wurden die daran absorbierten Cycloisomaltooligosaccharide schrittweise mit Ethanol eluiert, wobei die Konzentration bei jeder Elution um 5% erhöht wurde. Die größte Menge der Ziel-Cycloooligosaccharide war in der mit 20%igem Ethanol eluierten Fraktion enthalten. Dieses Eluat wurde auf einem Rotationsverdampfer konzentriert und dann durch HPLC auf einer TSK-Gel-Amid 80-Säule analysiert (eine Trennungs-Adsorptionschromatographie-Säule, hergestellt von Tohso Co., Ltd.). Das Ergebnis ist in Figur 3A angegeben. Diese rohe Cycloisomaltooligosaccharidlösung wurde auf einem Rotationsverdampfer konzentriert und dann einer HPLC auf einer YMC-PA43-Säule unterzogen (eine präparative Trennungs-Adsorptionschromatographie-Säule, hergestellt von Yamamura Kagaku Co., Ltd.) und auf diese Weise in die einzelnen Cycloisomaltooligosaccharide aufgetrennt.

Jede Fraktion wurde mit einem Rotationsverdampfer konzentriert. Zur Entfernung der als Verunreinigungen beigemischten linearen Isomaltooligosaccharide wurde dem Konzentrat Glukodextranase (Dextranase vom Exo-Typ) zugegeben und man ließ die Mischung über Nacht bei 40°C reagieren. Die Reaktionslösung wurde zur Beendigung der Umsetzung gekocht, dann zur Entfernung der denaturierten Proteine zentrifugiert und erneut auf eine YMC-PA43-Säule für eine HPLC aufgetragen, um die einzelnen Cycloisomaltooligosaccharide aufzutrennen. Jede Fraktion wurde auf einem Rotationsverdampfer konzentriert

und das resultierende Konzentrat wurde auf die Reinheit des Oligosaccharids mit HPLC auf einer TSK-Gel-Amid 80-Säule (eine Trennungs-Adsorptionschromatographie-Säule, hergestellt von Tohso Co., Ltd.) analysiert. Das Ergebnis ist in Figur 3B-D dargestellt. Für jedes Oligosaccharid wurde eine Reinheit von 98% oder höher erzielt. Die Oligosaccharid-Fractionen wurden gefriergetrocknet, wobei etwa 60 mg Cycloisomaltoheptaose, etwa 200 mg Cyclomaltooctaose bzw. etwa 100 mg Cycloisomaltوناose erhalten wurden.

### Beispiel 2

500 ml-Kolben, jeweils gefüllt mit 100 ml eines Flüssigmediums (Leitungswasser, pH 7,0), zusammengesetzt aus 1% Dextran 40 (hergestellt von Meito Sangyo Co., Ltd.), 1% Pepton (Kyokuto Seiyaku Kogyo Co., Ltd.), 0,5% NaCl und 0,1% Hefeextrakt (hergestellt von Difco), wurden bei 120°C während 20 Minuten sterilisiert. Der Bakterienstamm *Bacillus* sp. T-3040 (FERM BP-4132) wurde auf das Medium überimpft und bei 30°C während einem Tag unter Schütteln kultiviert.

1000 ml der so erhaltenen Kultur wurden auf 1 l Medium in einem 500 l-Tank mit der gleichen Mediumzusammensetzung überimpft, der unter gleichen Bedingungen, wie vorstehend beschrieben, sterilisiert wurde, und der Mikroorganismus wurde während 3 Tagen unter Schütteln bei 30°C, 0,25 vvm und 70 Upm aerob kultiviert. Nach Beendigung der Kultur wurde der Mikroorganismus aus 300 l der Kulturlösung durch Ultrafiltration mit einer Microza®-Membran (hergestellt von Asahi Kasei Co., Ltd.) entfernt und die mikroorganismussfreie Kultur wurde über eine Hohlfasermembran (Molekulargewichtsabtrennung >6000) auf 6,3 l Flüssigkeit aufkonzentriert und das resultierende Konzentrat wurde in Aliquots von 900 ml aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

900 ml des Konzentrats wurden zur Reinigung der Cycloisomaltoligosaccharid-Synthase verwendet. Das Konzentrat wurde aufgetaut und dann über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM EDTA dialysiert. Das Dialysat wurde zur Entfernung der unlöslichen Stoffe zentrifugiert und der Überstand wurde auf eine mit dem gleichen Puffer voräquiliбриerten DEAE-Sepharose-CL6B-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit dem gleichen Puffer wurde das absorbierte Protein mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0-0,8 M eluiert. Fraktionen mit Enzymaktivität (320 ml) wurden vereinigt und Ammoniumsulfat wurde bis zu einer Endkonzentration von 1,0 M zugegeben. Anschließend wurden die unlöslichen Stoffe durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand wurde in der gleichen Weise, wie nachstehend beschrieben, durch präparative HPLC gereinigt. Der Überstand wurde auf eine TSK-Gel-Phenyl-5PW-Säule, voräquiliбриert mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), der 1,0 M Ammoniumsulfat und 10 mM EDTA ent-

hielt, aufgetragen und dann mit dem gleichen Puffer gewaschen. Das adsorbierte Protein wurde mit einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 1,0-0 M eluiert.

5 Fraktionen (150 ml) mit Enzymaktivität wurden vereinigt und anschließend wurde dazu Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 1,0 M zugegeben. Unlösliche Stoffe wurden durch Zentrifugieren entfernt und der Überstand wurde erneut auf eine TSK-Gel-Phenyl-5PW-Säule aufgetragen, die mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0), enthaltend 1,0 M Ammoniumsulfat und 10 mM EDTA, voräquilibriert worden war. Die Säule wurde dann mit dem gleichen Puffer gewaschen und einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen, worin die Ionenstärke des Ammoniumsulfats auf 0,3 M erniedrigt wurde, und das adsorbierte Protein wurde mit einem linearen Ammoniumsulfat-Gradienten von 0,3-0 M eluiert.

15 Fraktionen mit Enzymaktivität (88 ml) wurden gesammelt und bis zu etwa 1 ml Flüssigkeit konzentriert, die wiederum mit 20 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM EDTA verdünnt wurde. Diese Lösung wurde auf eine TSK-Gel-DEAE-5PW-Säule aufgetragen, die mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM EDTA voräquilibriert worden war, dann mit dem gleichen Puffer und einmal mit 0,15 M NaCl gewaschen. Das adsorbierte Protein wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0,15-0,4 M eluiert.

20 Fraktionen mit Enzymaktivität (12 ml) wurden gesammelt und durch Ultrafiltration auf 0,9 ml Flüssigkeit aufkonzentriert. Ein Aliquot von 0,3 ml des so erhaltenen Enzymkonzentrats wurde auf eine TSK-Gel-G3000SW-Säule, voräquilibriert mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 10 mM EDTA und 200 mM NaCl, aufgetragen und dann mit dem gleichen Puffer eluiert. Das zurückbleibende Enzymkonzentrat (0,6 ml) wurden in Aliquots von 0,3 ml aufgeteilt und jedes Aliquot wurde in der gleichen Weise, wie vorstehend beschrieben, auf die Säule aufgetragen. Fraktionen mit Enzymaktivität wurden gesammelt und durch eine SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis zeigte eine einzige Bande, was anzeigt, daß die Probe frei von Verunreinigungen ist.

30 In dem vorstehenden Verfahren wurde die gereinigte Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase (12 mg) erhalten. Die physikochemischen Eigenschaften des vorliegenden gereinigten Enzyms entsprachen den vorstehend angegebenen. Es wurde bestätigt, daß die Inkubation von Dextran mit dem vorliegenden gereinigten Enzym zur Bildung von Cycloisomaltooligosacchariden führt.

Beispiel 3

300 l Flüssigkultur von *Bacillus* sp. T-3040 wurden über eine Microza®-Membran geleitet, um den Mikroorganismus zu entfernen, und die mikroorganismusfreie Kultur wurde über eine Hohlfasermembran (Molekulargewichtsabtrennung >6000) auf 6,3 l Flüssigkeit aufkonzentriert und dann in Aliquots von je 900 ml für die Lagerung bei -20°C aufgeteilt. Ein Teil des Kulturkonzentrats wurde mit 10 l einer wäßrigen Lösung von 100 g Dextran (hergestellt von Meito Sangyo Co., Ltd.) in 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) gemischt und die Mischung wurde während 48 Stunden bei 40°C inkubiert. Die Lösung wurde zur Beendigung der Umsetzung gekocht und mit Aktivkohle versetzt, um nicht umgesetztes Dextran zu adsorbieren. Nach Entfernung der Aktivkohle wurde der Überstand auf eine mit deionisiertem Wasser voräquilibrierte Aktivkohlesäule aufgetragen und dann mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die adsorbierten Oligosaccharide wurden mit einem linearen Ethanol-Gradienten eluiert. Cyclooligosaccharid-Fractionen wurden vereinigt, dann konzentriert und auf eine mit deionisiertem Wasser voräquilibrierte ODS-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden die Oligosaccharide mit einem linearen Ethanol-Gradienten eluiert und die Fractionen eines jeden Oligosaccharids wurden vereinigt und gefriergetrocknet.

Die Gewichtsausbeute der so erhaltenen Cycloisomaltooligosaccharide betrug 2,1 g für Cycloisomaltoheptaose, 4,6 g für Cycloisomaltooctaose und 1,0 g für Cycloisomaltononaose. Die Gesamtausbeute der Cycloisomaltooligosaccharide betrug 7,7%. Die HPLC-Analyse zeigte, daß die Reinheit eines jeden Oligosaccharids bei 98% oder höher lag. Figur 4 zeigt HPLC-Profile der Cycloisomaltooligosaccharide.

Die HPLC-Analyse wurde auf einer TSK-Gel-Amid-Säule durchgeführt (eine Trennungs-Adsorptionschromatographie-Säule, hergestellt von Tohso Co., Ltd.). In Figur 4 entspricht A der Cycloisomaltoheptaose-Fraktion; B der Cycloisomaltooctaose-Fraktion; C der Cycloisomaltononaose-Fraktion; und D entspricht dem Standard.

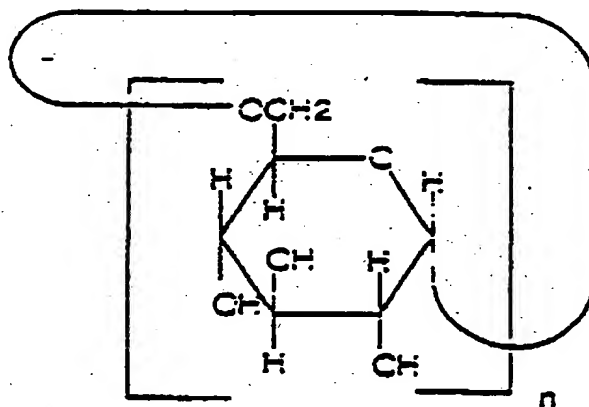
# Patentansprüche

1. Cycloisomaltooligosaccharid, gewählt aus der Cycloisomaltoheptaose mit einer aus 7 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur, Cycloisomaltooctaose mit einer aus 8 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur und Cycloisomaltotonaose mit einer aus 9 Glukoseresten in  $\alpha$ -1,6-Bindung aufgebauten cyclischen Struktur umfassenden Gruppe.

2. Cycloisomaltooligosaccharid nach Anspruch 1, wiedergegeben durch Formel I:

10

15



(I)

20 worin n für eine ganze Zahl von 7-9 steht.

3. Cycloisomaltooligosaccharid nach Anspruch 2, wobei n für 7 steht.
4. Cycloisomaltooligosaccharid nach Anspruch 2, wobei n für 8 steht.
5. Cycloisomaltooligosaccharid nach Anspruch 2, wobei n für 9 steht.
6. Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase mit den physikochemischen Eigenschaften:
  - 30 ① Wirkung auf ein Polymer aus Glukosen, die durch  $\alpha$ -1,6-Bindungen verknüpft sind, wie Dextran, zur Bildung eines Cycl isomalto lig saccharids durch intramolekulare Transglykosylierungsreaktionen;
  - ② Substratspezifität der Wirkung auf Dextran mit einer  $\alpha$ -1,6-Bindung als



- 1 eine Hauptkette, jedoch nicht auf Amylopektin und Pullulan mit einer nur teilweisen  $\alpha$ -1,6-Bindung von Glukosen in der Struktur; und  
⑥ optimaler pH in der Umgebung von pH 5,5 und Stabilitäts-pH im Bereich von pH 4,5-8,5.

5

7. Verfahren zur Herstellung von Cycloisomaltooligosaccharid-Synthase, umfassend das Kultivieren in einem dextranhaltigen Medium eines zur Gattung *Bacillus* gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym gemäß Anspruch 6 zu produzieren, und dann Gewinnen des Enzyms aus der Kultur.

10

8. Verfahren zur Herstellung der Cycloisomaltooligosaccharide nach Anspruch 1, umfassend das Wirkenlassen des Enzyms nach Anspruch 6 auf Dextran, um Cycloisomaltooligosaccharide zu bilden.

15

9. Verfahren zur Herstellung der Cycloisomaltooligosaccharide nach Anspruch 1, umfassend das Wirkenlassen einer mikroorganismusfreien Mischung, die durch Kultivieren in einem dextranhaltigen Medium eines zur Gattung *Bacillus* gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Enzym nach Anspruch 6 zu produzieren, erhalten worden ist, auf Dextran, um die Cycloisomaltooligosaccharide zu bilden.

20

10. Verfahren zur Herstellung von Cycloisomaltooligosacchariden, umfassend das Kultivieren in einem  $\alpha$ -1,6-glukanhaltigen Medium eines zur Gattung *Bacillus* gehörigen Mikroorganismus, der in der Lage ist, das Cycloisomaltooligosaccharid gemäß Anspruch 1 zu produzieren, und dann Gewinnen des Cycloisomaltooligosaccharids aus der Kultur.

25

30

35

1/4

FIG. 1

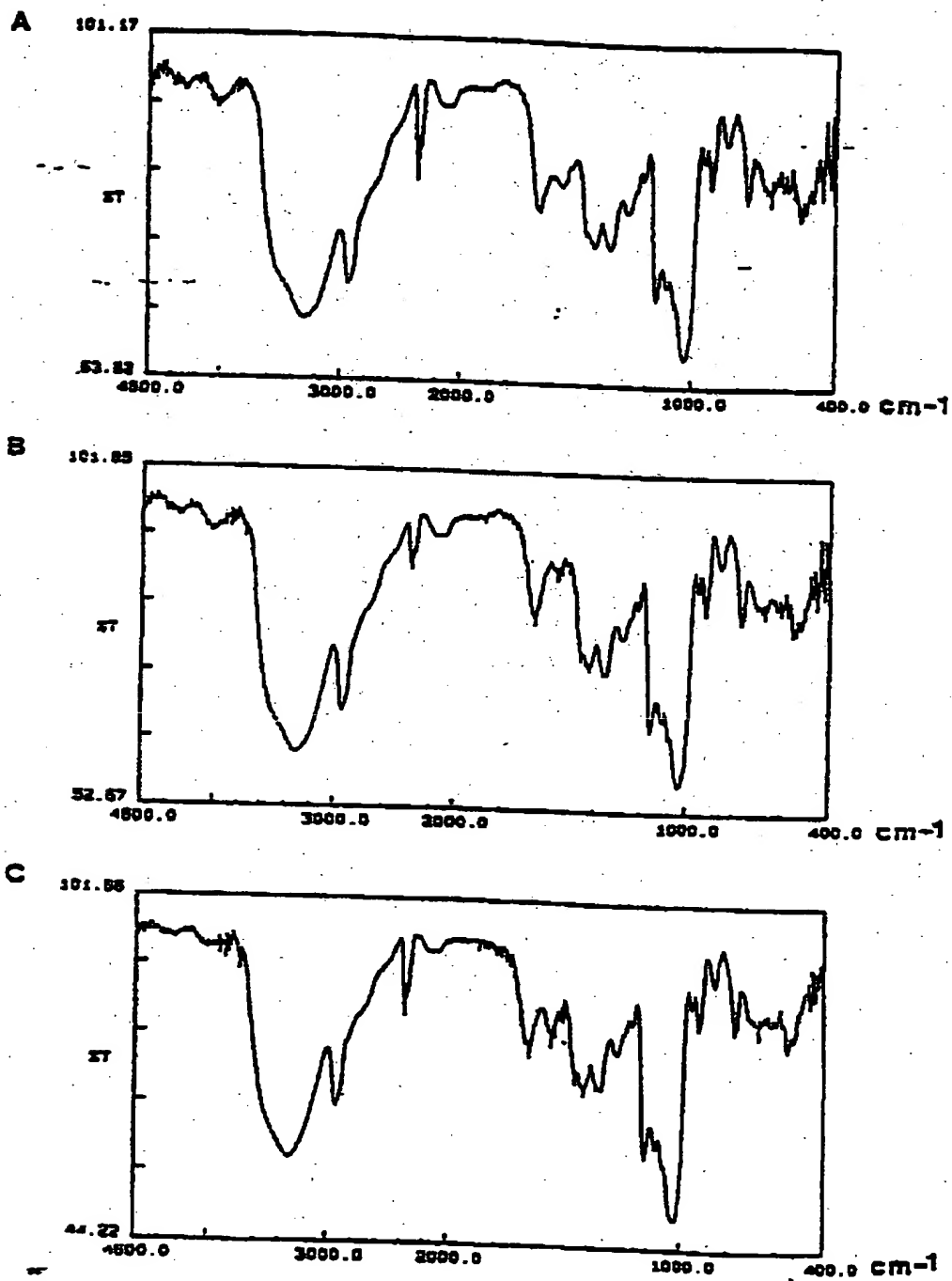
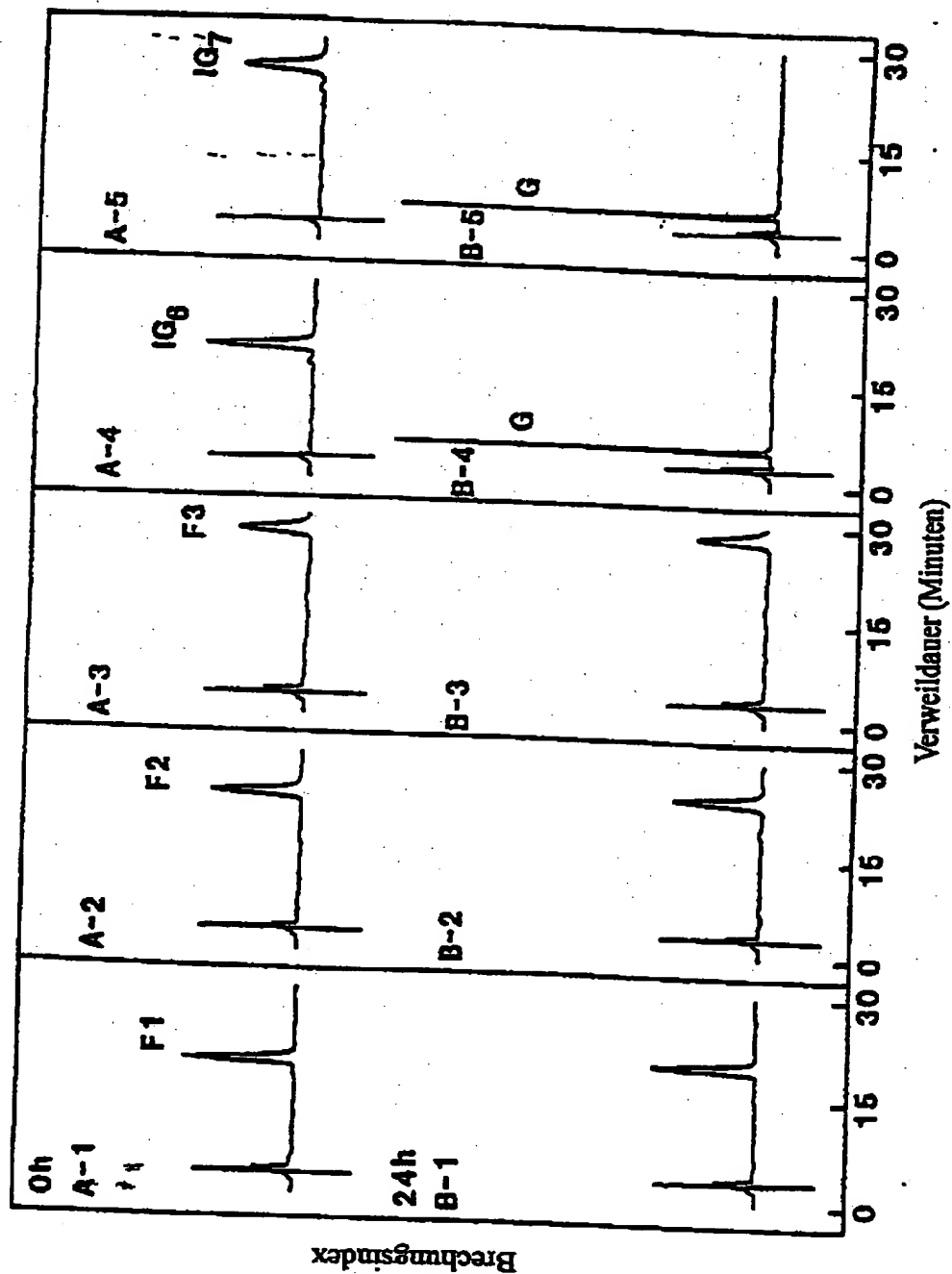
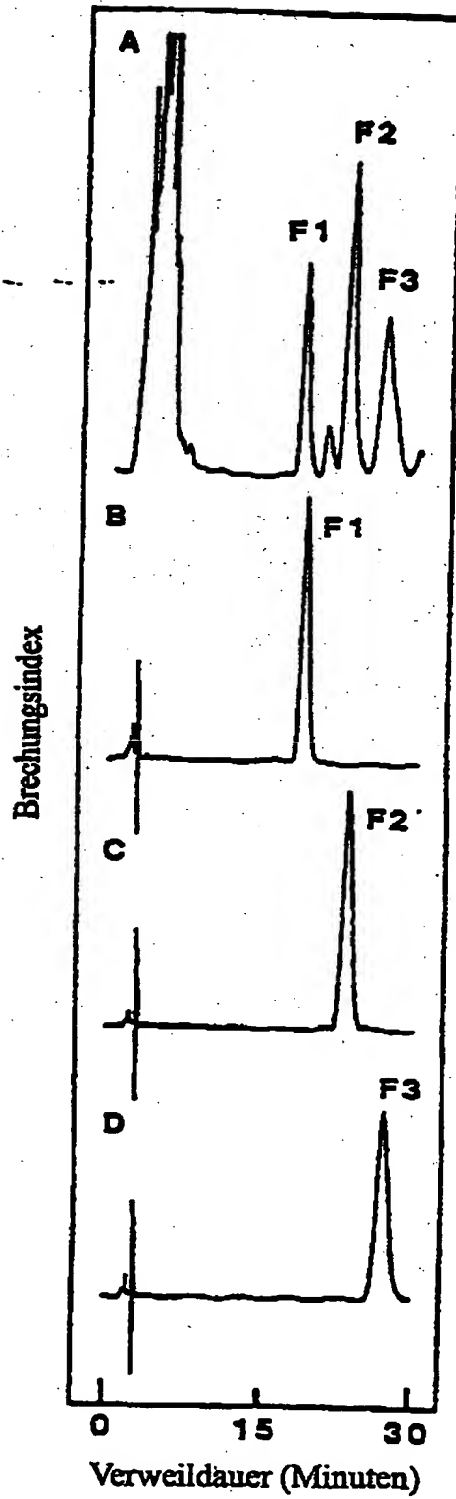


FIG. 2



F<sub>1</sub>: Cycloisomaltose    IG<sub>6</sub>: Isomaltose  
 F<sub>2</sub>: Cycloisomaltotriose    IG<sub>7</sub>: Isomaltotriose  
 F<sub>3</sub>: Cycloisomaltotetraose    G: Glucose

FIG. 3



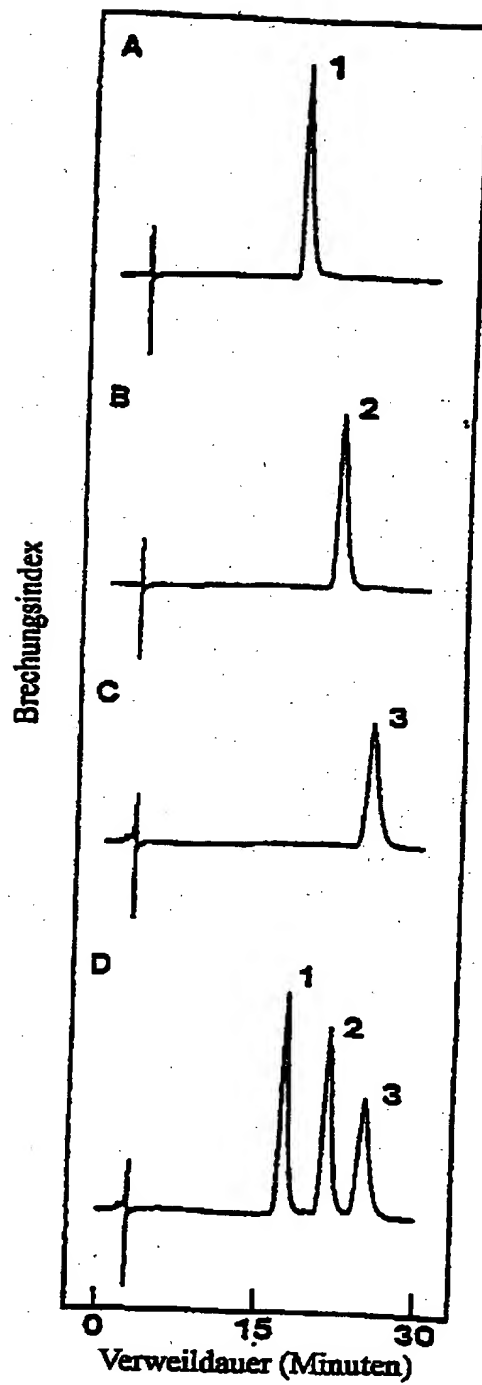
F1: Cycloisomaltoheptaos

F2: Cycloisomaltooctaose

F3: Cycloisomaltotriosa

FIG. 4

4/4



1. Cycl isomaltoheptaose
2. Cyclol omaltooctaose
3. Cycloisomaltononaose

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**